

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E
EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

ALAN DA SILVA FELISBINO

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
Hibiscus acetosella Welw. ex Hiern.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais da
Universidade do Extremo Sul
Catarinense - UNESC, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Ambientais

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Patrícia de
Aguiar Amaral

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª Silvia
Dal Bó

CRICIÚMA, SC
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F315a Felisbino, Alan da Silva.

Análise fitoquímica e avaliação do potencial farmacológico de extratos hidroalcoólicos de *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern / Alan da Silva Felisbino ; orientadora : Patrícia de Aguiar Amaral ; co-orientadora : Silvia Dal Bó . – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.
69 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2014.

1. Hibiscus acetosella – Uso terapêutico. 2. Plantas medicinais. 3. Química vegetal. 4. Plantas - Análise.
I. Título.

CDD. 22. ed. 615.53



unesc

Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Humanidades, Ciências e Educação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

PARECER

Os membros da Banca Examinadora homologada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (Mestrado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **ALAN DA SILVA FELISBINO** sob o título: “**Análise fitoquímica e avaliação do potencial farmacológico de extratos hidroalcoólicos de *Hibiscus acetosella* Welw.ex Hiern.**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Criciúma, SC, 27 de fevereiro de 2014.

Prof.ª Dra. Maique Weber Biavatti
Primeiro Examinador

Prof.ª Dra. Vanilde Citadini Zanette
Segundo Examinador

Prof.ª Dra. Patrícia de Aguiar Amaral
Presidente da Banca e Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais
que me ensinaram a perseguir meu
ideal com dedicação e coragem.
Minhas referências!

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Modificamo-nos a cada tentativa de buscar respostas às nossas “aflições de pesquisador”. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que nos envolvemos em pesquisa. E são a essas pessoas que gostaria de agradecer:

Agradeço à minha família – meus pais, meu irmão, minha cunhada e minha sobrinha – pelo apoio e pelo amor que sempre me deram. Especialmente, gostaria de agradecer aos meus pais que se sacrificam para que seus filhos realizem seus sonhos. Agradeço por sempre me incentivarem a alcançar caminhos cada vez mais distantes, pelo carinho, pela segurança, pela dedicação e exemplo.

Agradeço ao Prof^a Dr^a Patrícia de Aguiar Amaral por ter me aceito em seu laboratório, ter me orientado desde a minha iniciação científica e por ter me proporcionado um imenso aprendizado nesse período. É mais importante do que isso, para mim, é agradecer por sua amizade, por sua confiança e por acreditar em mim. Sei que posso contar com ela para discutir a ideia de um projeto quanto para dar uma boa risada. Sua compreensão é um traço marcante em sua maneira de lidar com as pessoas, traço este que foi fundamental para a realização deste trabalho. Aquela que me acolheu durante alguns dias em sua casa durante o estágio na França.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a Dr^a Silvia Dal Bó pela disponibilidade, as suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Plantas Medicinais por terem a capacidade de um dia longo de trabalho, por vezes cansativo, em uma tarefa mais agradável: Marília Schutz Borges, Paula Cardoso, Cassiane Vieira Justino, Jéssica De Luca Machado, Luan Ramos, Graziela de Sá, Michele Darós Freitas, Renato Panhan e também aos outros acadêmicos que já saíram do grupo de pesquisa, mas que de alguma forma por auxiliaram nos experimentos em laboratório. Em especial à Vanessa Rodrigues Nicolau, a qual me acompanhou na viagem/estágio à Europa, que foi de um aprendizado grandioso. Foram mais de um mês de convivência intensiva, dividindo poltronas de avião,

quarto (sala), pronto-socorro e principalmente todos os dias no laboratório falando uma língua a qual não estávamos habituados.

Agradeço aos amigos e colegas dos Laboratórios de Bioquímica, Química e Microbiologia, especialmente Priscilla Cardoso, Grazielle Milioli, Edson, Suelen Cardoso Izé e Jéssica Piacentini, por terem sido solícitos sempre que precisei de ajuda.

À coordenação do Mestrado em Ciências Ambientais que esteve sempre à disposição.

Às coordenadoras do Curso de Farmácia da UNESC: Angela Erna Rossato e Juliana Lora pela a liberdade e confiança referente ao meu trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em todos os momentos.

Ao 4º Batalhão do Corpo de Bombeiros Militar de Santa Catarina por compreender a importância deste trabalho e, assim, me liberar do trabalho (quase) sempre que preciso.

Manifesto, ainda, um sentido e profundo reconhecimento à minha família (tias (os), primas (os), avós...) pelo apoio incondicional ao longo destes anos, os quais sempre torceram para que eu pudesse alcançar mais um objetivo na minha vida. Expresso sentimento idêntico em relação a todos os meus amigos de longa data. A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim. Muito obrigado... Ninguém vence sozinho!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Dentre a diversidade da flora brasileira, encontra-se a família Malvaceae, a qual se destaca pela grande variedade de compostos naturais encontrados dentre as espécies com propriedades farmacológicas comprovadas. O uso popular aliado à investigação científica conduziu-nos para o estudo de *Hibiscus acetosella* WeLw. ex Hiern., popularmente conhecida como vinagreira, groselheira e quiabo-roxo. Relatos científicos mostram ação de outras espécies de *Hibiscus* com efeito diurético, anti-hipertensivo e no sistema cardiovascular. O presente trabalho teve como objetivo analisar a composição fitoquímica de extratos das folhas de *H. acetosella*, bem como avaliar a atividade cardioprotetora com possível alternativa para reatividade vascular. Avaliou, também, a citotoxicidade desta espécie a fim de permitir uma análise da relação risco/benefício de um eventual uso terapêutico pela população usuária da planta. O extrato de *H. acetosella* foi particionado com solventes de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol) e analisados por métodos cromatográficos de CCD e CLAE. A análise citotóxica *in vitro* foi realizada pelo método de MTT em culturas específicas para linhagem B16 e HaCaT. O controle positivo foi tratado com os quimioterápicos padrões Vincristina e Doxorrubicina. Para a análise farmacológica do extrato bruto, 60 animais foram divididos igualmente em seis grupos: controle, dieta hipersódica, hipersódica comcomitante com tratamento com captopril 50 mg/kg; os outros três grupos de animais foram submetidos à dieta hipersódica e tratados com *H. acetosella* nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 250 mg/kg. O tratamento teve duração de cinco semanas e, após esse período foi aferida a pressão arterial basal e avaliação do comportamento da pressão arterial frente à agentes vasodilatador e vasoconstritor. A análise fitoquímica constatou a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e ácido cafeico, além de saponinas. Pôde-se constatar que o extrato e as frações testadas de *H. acetosella* não mostraram atividade citotóxica significativa para as linhagens testadas. Segundo avaliação *in vivo*, o excesso de sal gerou alteração na reatividade do endotélio vascular e o tratamento com extrato de *H. acetosella* apresentou atividade protetora sob este, mostrando, assim, ser efetiva no sistema cardiovascular com atividade de vasoproteção.

Palavras-chave: *Hibiscus acetosella*. Malvaceae. Citotoxicidade. Sistema Cardiovascular. Vasoproteção.

ABSTRACT

Phytochemical analysis and evaluation of potential pharmacologic of hydroalcoholic extracts of *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern.

Among the diversity of flora, there is the Malvaceae family, which stands out from the variety of natural compounds found among the species proven to have pharmacological properties. The popular use combined with scientific research led us to the study of *Hibiscus acetosella* WeLw. ex Hiern., popularly known as hibiscus and okra. Scientific reports have shown other species of *Hibiscus* with the effects of diuretic, antihypertensive and cardiovascular system. This study aimed to analyze the phytochemical composition of these extracts from the leaves of *H. acetosella* and evaluated the cardioprotective activity with possible alternative to improve vascular reactivity. It also evaluated the cytotoxicity of this species by analyzing the risk/benefit ratio of any therapeutic use of this plant species by the population. The extract of *H. acetosella* was fractionated with solvents that have increasing polarity (dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol), which were analyzed by chromatographic methods TLC and HPLC. The cytotoxic analysis in vitro was evaluated by the MTT method, using specific cell strains of B16 and HaCaT. To perform the pharmacological analysis of the crude extract, 60 animals were equally divided into six groups: control (regular-salt diet), group high-salt diet, group high-salt diet that was treated with captopril 50 mg/kg and the other three groups were fed with high-salt diet and treated with extract of *H. acetosella* at doses of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 250 mg/kg per a period of five weeks. All groups were submitted to measure the basal blood pressure and an evaluation of their blood pressure behavior was made with the infusions of vasodilator and vasoconstrictor drugs. Phytochemical analysis revealed the presence of phenolic compounds such as caffeic acid, flavonoids and saponins. According to this study, it is clear that the extract and the fractions tested of *H. acetosella*, showed no significant cytotoxic activity against the tested strains. According to the evaluation in vivo, the excess of the salt fed generated a change in the reactivity of the vascular endothelium and the treatment with extract of *H. acetosella* presented a protective activity to this vascular endothelium, thus proving to be effective in the cardiovascular system such as vasoprotection.

Keywords: *Hibiscus acetosella*. Malvaceae. Cytotoxicity. Cardiovascular System. Vasoprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Partes aéreas de <i>H. acetosella</i>	22
Figura 2 – Perfil cromatográfico dos padrões, analisados em CLAE/DAD em 280 nm, utilizando o programas de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.....	40
Figura 3 – Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas secas de <i>H. acetosella</i> , analisado em CLAE/DAD em 280 nm, utilizando o programa de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.....	41
Figura 4 – Perfil cromatográfico dos padrões, analisados em CLAE/DAD em 310 nm, utilizando o programas de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.....	41
Figura 5 – Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas secas de <i>H. acetosella</i> , analisado em CLAE/DAD em 310nm, utilizando o programa de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.....	42
Figura 6 – Citotoxicidade das frações de <i>H. acetosella</i> frente às linhagens celulares testadas.	44
Figura 7 – Pressão arterial média de ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, tratados ou não com <i>H. acetosella</i>	46
Figura 8 – Alteração da pressão arterial média em resposta à fenilefrina (Phe 3 nmol/kg – 30 nmol/kg) em ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, que receberam ou não tratamento com <i>H. acetosella</i> ..	48
Figura 9 – Alteração da pressão arterial média em resposta à acetilcolina (ACh 3 nmol/kg – 30 nmol/kg) em ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, que receberam ou não tratamento com <i>H. acetosella</i> ..	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina (Acetylcholine).
B16	Linhagem celular de melanoma de murinho.
CAPE	Éster fenetílico ácido cafeico (Caffeic Acid Phenethyl Ester).
CCD	Cromatografia de Camada Delgada (TLC - Thin Layer Chromatography).
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance/Pressure Liquide Chromatography).
CO ₂	Dióxido de Carbono.
DAD	Detector com Arranjo de Diodo (Diode Array Detector).
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina.
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina (Guanosine monophosphate cyclique).
HaCaT	Linhagem celular de queratinócito de humanos.
HDL	Lipoproteína de alta densidade (High-Density Lipoprotein).
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% das células testadas.
USNCI	Instituto nacional do câncer dos Estados Unidos (U.S. National Cancer Institute).
LaPlaM	Laboratório de Plantas Medicinais.
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein).
mAU	mili unidade de absorvância (mili Absorbance Units).
MPO	Mieloperoxidase (Myeloperoxidase).
NaCl	Cloreto de Sódio.
NF- κ B	Factor nuclear kappa B (Nuclear factor kappa B).
NO	Óxido Nítrico (Nitric Oxide).
Phe	Fenilefrina (Phenylephrine).
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate).
R _f	Fator de retenção de um composto.
UV	Ultravioleta.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 BREVE HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS	17
2.2 ETNOFARMACOLOGIA.....	18
2.4 FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	19
2.5 GÊNERO <i>Hibiscus</i> L.	21
2.6 <i>Hibiscus acetosella</i> WeLw. ex Hiern.....	22
2.7 SEGURANÇA DE USO PELA POPULAÇÃO (CITOTOXICIDADE).....	24
2.8 DOENÇAS CARDIOVASCULARES - DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	25
2.8.1 Mecanismo da disfunção endotelial	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	29
4.2 EXTRATOS.....	29
4.2.1 Fracionamento líquido-líquido	29
4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA	29
4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	31
4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA	31
4.4.1 Cultura de células e tratamento.....	31
4.4.2 Bioensaio MTT (viabilidade celular).....	32
4.5 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	33
4.5.1 Animais	33
4.5.2 Procedimento para indução da disfunção endotelial em ratos.....	33
4.5.3 Procedimentos para registro da pressão arterial em ratos.....	33
4.5.3.1 Protocolos experimentais	34
4.5.3.1.1 Avaliação da pressão arterial em animais do grupo controle.....	35
4.5.3.1.2 Avaliação da pressão arterial em animais submetidos à dieta hipersódica.....	35
4.5.3.1.3 Avaliação da pressão arterial em animais submetidos à dieta hipersódica juntamente com uso de anti-hipertensivo padrão	35
4.5.3.1.4 Avaliação dos efeitos de <i>H. acetosella</i> em animais submetidos à dieta hipersódica.....	35
4.5.4 Análise estatística	36

5 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS	37
5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA	37
5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	43
5.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	45
6 CONCLUSÃO	52
7 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas como alimento sempre existiu; assim, os homens buscam retirar da natureza recursos para melhorar sua qualidade de vida. Desde a pré-história o homem procurou aproveitar os princípios ativos existentes nos vegetais, embora de modo totalmente empírico ou intuitivo, baseado em descobertas ao acaso (BERG, 1993; HEYWOOD, 2011).

A utilização das plantas medicinais com finalidade terapêutica é normalmente de origem popular e são empregadas em preparações tradicionais (chás, sucos, xaropes, tinturas, unguentos, dentre outros), podendo, muitas vezes, ser o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos (AMOROZO, 2002; OLIVEIRA et al., 2012; RYBICKI et al., 2012). Essa prática, de cunho empírico, não foi completamente substituída pelos fármacos sintéticos (MACIEL, 2002; HEINRICH, 2008; DHAMI, 2013).

A diversidade química dos vegetais está relacionada ao seu metabolismo secundário, o que proporciona uma fonte rica de material de partida para descoberta de moléculas bioativas e possível desenvolvimento de novos fármacos (GURIB-FAKIM, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Por conseguinte, através dessa fonte são desenvolvidos os fitoterápicos, medicamentos que utilizam matérias-primas vegetais em sua composição.

Tão antiga quanto o próprio homem, a fitoterapia, como recurso terapêutico, avançou pela história e hoje, em todo o mundo, é objeto de interesse de pesquisadores e da sociedade (HALBERSTEIN, 2005; SA; ELISABETSKY, 2012). Assim, o potencial farmacológico das plantas medicinais utilizadas tradicionalmente tem sido estudado e comprovado a partir da iniciativa de pesquisas (CAVEROA; AKERRETA; CALVO, 2013; CHUA, 2013; NDHLALA et al., 2013; SHAHAT; MARZOUK, 2013). A descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais levou ao isolamento de fármacos, como isolamento de morfina a partir do ópio, cocaína, codeína, quinino, além da digitoxina, das quais algumas estão ainda em uso (KINGHORN, 2001; SAMUELSSON, 2004; BARREIRO; BOLZANI, 2009; MISHRA; TIWARI, 2011).

Dentre a diversidade da flora brasileira e mundial, produtos naturais extraídos de plantas que pertencem à família Malvaceae são utilizados no tratamento de muitas doenças em todo o mundo (MAGANHA et al., 2010). Um gênero de destaque dessa família é

Hibiscus, com aproximadamente 300 espécies, as quais têm sido utilizadas em várias aplicações na medicina tradicional. Investigações farmacológicas indicam algumas espécies com atividades biológicas úteis como anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antipirético, hepatoprotetor, antidiarreicos, antiespermatogênica, antitumoral, antidiabéticos, anticonvulsivantes, antihelmínticas imunomodulador, antioxidante e antimutagênica (MAGANHA et al., 2010; ALQASOUMI, 2012; COSTA et al., 2012; HOPKINS et al., 2013; YANG et al., 2013).

O uso popular aliado à investigação científica constatada pela literatura conduziu-nos para o estudo de *Hibiscus* direcionando o delineamento para *Hibiscus acetosella* WeLw. ex Hiern., planta de origem africana, que cresce espontaneamente no sul do Brasil, e muito utilizada em Criciúma e região. Estudos preliminares realizados no Laboratório de Plantas Medicinais LaPlaM/UNESC, constataram a presença de antocianinas nas flores de *H. acetosella* e nas folhas foram identificados, dentre outras classes, flavonoides (Dados não apresentados), que estão relacionados em algumas espécies com o efeito anti-hipertensivo. Tal fato estimula a investigação da atividade protetora do sistema cardiovascular (AJAY et al., 2007; HOPKINS et al., 2013).

H. acetosella apresenta grande relevância na medicina popular, principalmente na região sul de Santa Catarina. Suas folhas são utilizadas na forma de salada, de chás e sucos para melhorar o desempenho físico e mental, imunidade, anemia, ansiedade e angústia, sendo usada também para minimizar os efeitos associadas à menopausa, andropausa e hipertensão arterial (ROSSATO; CHAVES, 2012). Devido à grande utilização desta espécie pela população, e por ser pouco estudada na literatura científica, faz-se necessário pesquisar os compostos existentes na planta, bem como verificar seus efeitos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*.

Pelo exposto, o presente trabalho visou analisar a composição fitoquímica de extratos de *H. acetosella*, bem como avaliar a atividade cardioprotetora como possível alternativa para reatividade vascular. Pretendeu-se também, avaliar a citotoxicidade da espécie a fim de gerar dados que permitam uma análise da relação risco/benefício de um eventual uso terapêutico de *H. acetosella* e/ou de seus compostos químicos pela população usuária da planta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BREVE HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, e ainda como fonte de fármacos e de seus precursores (DUTRA et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

As observações populares sobre o uso e o efeito de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das atividades terapêuticas dos vegetais, utilizados com frequência, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (SANTOS; LIMA; FERREIRA, 2008).

Existem vários registros históricos sobre a utilização das plantas para tratamento de doenças desde 4.000 a.C. O primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C. e inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes fármacos de origem vegetal, animal ou mineral (COWEN; HELFAND, 1990). O manuscrito Egípcio “*Ebers Papyrus*” (1.500 a.C.), contém 811 prescrições e 700 fármacos e o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a.C.) relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax* spp), *Ephedra* spp, *Cassia* spp e *Rheum palmatum* L., inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas.

Segundo Berg (1993), é na Idade Moderna que a Botânica começa a tomar sua feição própria, porém sempre colaborando com a medicina. No século XX até a década de 70, principalmente depois da 2ª Guerra Mundial, com a descoberta de antibióticos e o incremento cada vez maior de medicamentos a base de fármacos sintéticos, houve um relativo abandono e inclusive certo ceticismo a respeito dos fármacos naturais.

No caso específico do Brasil, desde os tempos coloniais a rica flora brasileira tem sido objeto de estudo. Breitbach e colaboradores (2013) relataram que Martius, no século XIX, colaborou com um estudo taxonômico sobre plantas medicinais no Brasil, o qual incluía descrições detalhadas sobre a origem dos nomes de plantas populares, nomes científicos e o uso tradicional/medicinal de 730 espécies, formando um material altamente valioso para o desenvolvimento e conservação das espécies da Amazônia.

A *Suma Etnológica Brasileira* (RIBEIRO; RIBEIRO, 1987) reúne, em seu primeiro volume, uma série de trabalhos relacionados a etnobiologia, tratando de aspectos etnobotânicos e etnozoológicos de grupos indígenas do Brasil, que deu contribuição ao conhecimento das plantas medicinais brasileiras, entre as quais várias de origem amazônica. Outros estudos recentes visam demonstrar a importância dos recursos vegetais brasileiros no século XIX, através do estudo detalhado das fontes documentais, para fornecer uma riqueza de novas informações para a ciência moderna (MEDEIROS; ALBUQUERQUE, 2012).

A importância da conservação da biodiversidade pauta-se em seu papel fundamental para o fornecimento de diversos serviços ecossistêmicos, como a manutenção da quantidade e qualidade das águas, fertilidade do solo, equilíbrio climático, conforto térmico, além de seu valor biológico, estético e econômico, bem como sua função essencial na manutenção dos ciclos ambientais do planeta (TOMICH et al., 2011). Assim, no Brasil e no mundo, há novas tendências globais embasadas em pilares da conservação da diversidade biológica, incluindo as plantas bioativas com potenciais ainda desconhecidos. Consequentemente, pesquisadores das diferentes áreas da ciência vêm se dedicando a compreender as relações estabelecidas entre as pessoas e as plantas fundamentado em análises etnobotânicas, antropológicas, etnográficas, arqueobotânicas, históricas, etnofarmacológicas, dentre outros (MARINHO; SILVA; ANDRADE, 2011).

2.2 ETNOFARMACOLOGIA

Segundo Hanazaki (2006), abordagens etnobotânicas podem fornecer respostas importantes tanto para problemas de conservação biológica como para questões direcionadas para o desenvolvimento local de comunidades tradicionais.

As comunidades tradicionais são aquelas que possuem conhecimento da natureza, que se relacionam de forma muito íntima, em simbiose e dependência, conhecendo os segredos, suas propriedades e utilizando dos seus recursos para viver e transmitindo esses valores de geração a geração (STEFANELLO; NOGUEIRA, 2012). Surge, assim, o conhecimento tradicional que pode ser entendido como “o conjunto de saberes e saber-fazer a respeito do mundo natural e sobrenatural, transmitido oralmente, de geração em geração” e somente pode ser corretamente interpretado dentro do

contexto cultural em que é gerado (DIEGUES et al., 2000; ETKIN; ELISABETSKY, 2005; GRAZ; FALQUET; ELISABETSKY, 2010).

Há grande investigação científica no que diz respeito à atividade biológica de plantas medicinais (CAVEROA; AKERRETA; CALVO, 2013; CHUA, 2013; NDHLALA et al., 2013; SHAHAT; MARZOUK, 2013). Como estratégia na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica tem contribuído para resgatar conhecimento tradicional, visto que aborda a forma como as pessoas incorporam as plantas em suas práticas e tradições culturais (BALICK; COX, 1997). Nesse sentido, esforços devem ser realizados com objetivo de promover a conservação dos processos sociais, que permitem às populações tradicionais conservar e aumentar a biodiversidade como parte de seu modo de vida (ELISABETSKY, 1991; SÁ; ELISABETSKY, 2012). É válido observar também que a cultura deve ser protegida da mesma forma que a natureza. Por conseguinte, a OMS (1992; 2002) tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

Apesar das plantas medicinais já fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde. Segundo Brasileiro e colaboradores (2008), o estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre estas plantas. Desta forma, podemos planejar a pesquisa a partir de conhecimento empírico já existente, muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, que deverá ser testado em bases científicas. Ao registrar essas informações populares adequadamente, elas transformam-se em um conhecimento científico e posteriormente pode-se correlacionar com estudos químicos e farmacológicos (SÁ; ELISABETSKY, 2012).

2.4 FITOQUIMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Para a descoberta de ações farmacológicas de origem natural, as informações sobre os constituintes químicos são essenciais e são fornecidas pela triagem qualitativa fitoquímica de extratos vegetais (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MISHRA; TIWARI, 2011; DHAMI, 2013). O maior grupo de substâncias não-energéticas

presentes nos alimentos de origem vegetal, compostos fenólicos, por exemplo, são naturalmente produzidos no metabolismo secundário das plantas (HALLIWELL, 2007). Esse metabolismo surgiu ao longo do processo evolutivo como um mecanismo de defesa, protegendo-as contra diversos tipos de patógenos, contra radiação ultravioleta (UV) e auxiliando no processo de polinização, uma vez que contribuem para a coloração de planta (LATTANZIO et al., 2009).

Além de contribuírem para o mecanismo de defesa no reino vegetal, os metabólitos secundários são responsáveis pelas propriedades farmacológicas das plantas medicinais. Portanto, a avaliação do potencial terapêutico e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, saponinas, taninos, cumarinas, e outros metabólitos, têm sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos. Muitas destas substâncias naturais têm grandes possibilidades de serem aproveitadas como agentes terapêuticos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MISHRA; TIWARI, 2011; DHAMI, 2013).

Um grande número de estudos tem relatado que uma dieta rica em polifenóis, provenientes de espécies vegetais, corrobora para a promoção da saúde e para diminuir de incidência de algumas doenças, incluindo doenças cardiovasculares (HALLIWELL, 2007; FRAGA et al., 2010; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011; SHARMA, 2014; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). Uma das principais ações dos polifenóis é seu impacto sobre os radicais livres, limitando os efeitos nocivos do estresse oxidativo (ANDRADE; FASOLO, 2014). Além disso, esses compostos têm mostrado elevado efeito cardioprotetor possivelmente pela habilidade em reduzir o colesterol total e LDL (Lipoproteína de baixa densidade), inibir a agregação plaquetária, estimular a vasodilatação, bem como inibir vias pró-inflamatórias (RAHMAN et al., 2008; SHARMA, 2014).

Os flavonoides são compostos bioativos do grupo dos polifenóis, assim, possuem propriedade de sequestrar radicais livres e são queladores dos íons metálicos, protegendo os tecidos contra radicais livres de oxigênio e peroxidação de lipídios (HE et al., 2012; GRASSI; FERRI, 2014). Estudos epidemiológicos sugerem que a maior ingestão de flavonoides a partir de frutas e vegetais está associada à diminuição de risco para o desenvolvimento de doença

cardiovascular (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; MULVIHILL; HUFF, 2010; GRASSI; FERRI, 2014).

2.5 GÊNERO *Hibiscus* L.

Dentre a diversidade da flora brasileira, encontra-se a família Malvaceae, a qual se destaca pela grande variedade de compostos naturais encontrados dentre as espécies com propriedades farmacológicas comprovadas (TSENG; LEE, 2006; PIEME et al., 2010; ALQASOUMI, 2012; HOPKINS et al., 2013; RAJESWARI et al., 2013). A família Malvaceae, apresenta cerca de 250 gêneros e 4.200 espécies de distribuição cosmopolita, com predominância na região tropical e subtropical. No Brasil, esta família está representada por cerca de 31 gêneros e 200 espécies. Um gênero de destaque dessa família é *Hibiscus*, com aproximadamente 300 espécies (BARROSO et al., 1991; JUDD et al., 1999; SOUZA; LORENZI, 2008).

Um estudo com 29 espécies do gênero *Hibiscus* avaliou alguns dos constituintes das flores destas plantas e constatou que a maioria contém vitaminas A e E, como também precursores de carotenos e tocoferóis. Quanto à composição química, foi detectada a presença de flavonoides, destacando antocianina, quercetina com níveis variando de 2 a 192 mg/g e cianidina variando de 1 a 77 mg/g. As maiores concentrações de cianidinas foram constatadas em flores de coloração vermelho escuro (PUCKHABER; STIPANOVIC; BOST, 2002).

Espécies do gênero *Hibiscus* têm sido utilizadas em várias aplicações na medicina tradicional. Estudos com as espécies deste gênero demonstram inúmeras ações farmacológicas. Entre elas citam-se as análises com *Hibiscus syriacus* L. que apresentou ação inibitória para peroxidação de lipídios, citotoxicidade significativa contra células tumorais e ação antioxidante relacionada a um flavonoide isolado da casca do caule da planta (YUN et al., 1999). Pesquisa com *Hibiscus vitifolius* L. demonstrou atividade antinociceptiva (MALHOTRA; PAL SIGH, 2006) e o extrato alcoólico de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentou ação antinociceptiva e antipirética (REANMONGKOL; ITHARAT, 2007), além de hipotensora e hipolipemiante (HOPKINS et al., 2013), hepatoprotetor (ALQASOUMI, 2012), antidiabético (YANG et al., 2013), antioxidante (COSTA et al., 2012), dentre outros.

Entre as espécies do gênero *Hibiscus*, *H. sabdariffa* é a mais estudada, apresentando como principais constituintes as antocianinas, destacando-se, delfinidina-3-O-sambubioside e cianidina-3-O-sambubioside. Ojeda e colaboradores (2010) demonstraram que esses compostos, presentes nos cálices de *H. sabdariffa*, inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA), além de reduzir concentrações séricas de sódio sem modificar os níveis de potássio (NGAMJARUS; PATTANITTUM; SOMBOONPORN, 2010; WAHABI et al., 2010). Segundo Ajay e colaboradores (2007), extratos metanólicos dos cálices de *H. sabdariffa* induzem um efeito vasodilatador em aortas isoladas em modelo animal, direcionando, assim, o estudo de outras espécies deste mesmo gênero para atividades envolvendo o sistema cardiovascular.

2.6 *Hibiscus acetosella* WeLw. ex Hiern.

O uso popular aliado à investigação científica conduziu-nos para o estudo de *Hibiscus acetosella* WeLw. ex Hiern., popularmente conhecida como vinagreira, groselheira e quiabo-roxo. É uma planta arbustiva, bienal ou perene, ereta ou de crescimento disperso, de caule semi-lenhoso, vináceo e ramificado. Suas folhas possuem cor vinho escuro, nervuras palmadas e heterofílicas. As flores são solitárias, axilares, sésseis e de cor rosa-arroxeadas e fruto é uma cápsula (LORENZI; SOUZA, 2008) (figura 1). É originária da África e possui semelhanças botânicas com a *Hibiscus sabdariffa*.

Figura 1 – Partes aéreas de *H. acetosella*



Fonte: Autor (2014)

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Plantas Medicinais - LaPlaM/UNESC, constataram a presença de antocianinas nas flores de *H. acetosella* e nas folhas foram identificados compostos polifenólicos (Dados não apresentados).

Tsumbu e colaboradores (2011) descrevem que *H. acetosella* possui polifenóis e flavonoides, utilizando o extrato aquoso em um estudo de atividade antioxidante. Sob condições de inflamação celular, ocorreu diminuição significativa na formação de marcadores típicos de peroxidação lipídica avançada, como hidroperóxidos lipídicos e etileno. Além disso, o extrato foi capaz de inibir a formação de radicais livres numa fase precoce da peroxidação lipídica.

Em um modelo celular utilizando neutrófilos, os componentes presentes nos extratos de *H. acetosella*, além de atuarem como sequestradores de radicais livres, também estão envolvidos na resposta inflamatória de neutrófilos, especialmente pela inibição da enzima mieloperoxidase (TSUMBU et al., 2012).

Estudos realizados com algumas espécies do gênero *Hibiscus* têm relatado o efeito anti-hipertensivo, especialmente em plantas que possuem flavonoides (HERRERA-ARELLANO et al., 2004; HERRERA-ARELLANO et al., 2007; OJEDA et al., 2010). É relatado que o consumo de flavonoides pode mediar uma redução na pressão arterial, mostram que certos flavonoides exibem inibição da ECA *in vitro*, além de possuir propriedade antioxidante e ação cardioprotetora relevante (MULVIHILL; HUFF, 2010; OJEDA et al., 2010; GRASSI; FERRI, 2014). Essas informações, juntamente com a informação popular sobre utilização majoritária das folhas de *H. acetosella* em forma de salada e chás, estimulam a investigação da ação protetora do sistema cardiovascular do extrato das folhas de *H. acetosella*.

É necessária, ainda, a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, dentre outros). O uso pela medicina popular, baseado somente no conhecimento tradicional, não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (BRASIL, 2004).

2.7 SEGURANÇA DE USO PELA POPULAÇÃO (CITOTOXICIDADE)

O termo citotoxicidade significa causar efeito tóxico em nível celular. Neste contexto, as células expostas a um composto citotóxico podem responder de diversas maneiras. As células podem apresentar necrose, na qual elas sofrem alterações na permeabilidade da membrana e inibição enzimática, e como resultado da lise de células, podem parar de crescer ou de se dividir (ALBERTS et al., 2010). O mecanismo de apoptose ou “morte programada” é um processo celular fisiológico normal que ocorre por diferentes situações em que a célula é exposta, como por exemplo, na organogênese e hematopoese normal e patológica, na reposição fisiológica de determinados tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. A apoptose pode ser desencadeada por vários fatores, sendo eles: níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS), baixa quantidade de nutrientes à célula, privação de fatores de crescimento, choque térmico, radiação ionizante, danos ao DNA, agentes quimioterápicos e ligação de moléculas a receptores de membrana (ALBERTS et al., 2010; DOS SANTOS MONTAGNER et al., 2010; NELSON; COX, 2011).

Embora exista um amplo uso de plantas medicinais pela população, poucos trabalhos têm sido feitos para avaliar a toxicidade potencial das preparações fitoterápicas. O uso de preparações a base de plantas, ao contrário do senso comum, que as classifica como sendo naturais e isentas de reações adversas, podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos (BUSSMANN et al., 2011).

Pieme e colaboradores (2010) estudaram a atividade citotóxica de cinco espécies da família Malvaceae: *Sida acuta* Burm. f., *Sida cordifolia* L., *Sida rhombifolia* L., *Urena lobata* L., *Viscum album* L.. Os extratos apresentaram efeito antiproliferativo de células tumorais. Rosa e colaboradores (2006) mostraram que extrato metanólico de *Hibiscus tiliaceus* possui efeito protetor contra a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e peroxidação lipídica intracelular induzida. Lin e colaboradores (2012) comprovaram, em estudos *in vitro* e *in vivo*, que folhas de *H. sabdariffa* induzem apoptose de células de câncer prostático humano. Entretanto, *H. acetosella* possui poucos relatos na literatura

correlacionados com a citotoxicidade (TSUMBU et al., 2011; TSUMBU et al., 2012).

2.8 DOENÇAS CARDIOVASCULARES - DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Com base nos estudos publicados com outras espécies do gênero *Hibiscus* relatando efeito anti-hipertensivo e redução de risco de doenças coronárias, especialmente correlacionando com a presença de flavonoides e polifenóis na composição química das espécies (HERRERA-ARELLANO et al., 2004; HERRERA-ARELLANO et al., 2007; MULVIHILL; HUFF, 2010; OJEDA et al., 2010; HE et al., 2012; GRASSI; FERRI, 2014), surgiu a necessidade de verificar a ação protetora do sistema cardiovascular de *H. acetosella* focando na proteção do endotélio vascular.

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória. A “disfunção endotelial” deveria mais apropriadamente ser considerada com ativação endotelial, que pode contribuir eventualmente para a doença arterial, principalmente em determinadas condições (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007). A ativação endotelial representa uma mudança de um fenótipo quiescente para um que envolve resposta de defesa do hospedeiro. De fato, a maioria dos fatores de risco cardiovascular leva à ativação da maquinaria molecular no endotélio, que resulta na expressão de citocinas e moléculas de adesão designadas para interagir com leucócitos e plaquetas, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados a tecidos específicos (HANSSON, 2005).

A exposição prolongada ou repetida a fatores de risco cardiovasculares pode retirar o efeito protetor proporcionado pelas células endoteliais. Como consequência, não apenas o endotélio se torna disfuncional, mas também as células endoteliais podem perder sua integridade, podendo progredir para a senescência e se destacar para a circulação. Por conseguinte, a disfunção do endotélio pode ser definida como um desequilíbrio entre os fatores relaxantes e constritores, entre os mediadores pró-coagulantes e anticoagulantes, ou entre substâncias estimuladoras e inibidoras do crescimento e proliferação celular (MALLAT et al., 2000).

A disfunção endotelial é observada em estágios iniciais na maioria das doenças cardiovasculares e surge como um fator preditor independente para eventos clínicos na doença coronariana, hipertensão e falência cardíaca. Neste contexto, a avaliação da função endotelial passa de um intermediário na avaliação do benefício de tratamentos cardiovasculares e emerge como um alvo farmacológico direto (JOANNIDES; BELLIN; THUILLEZ, 2006; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010; KOZLOV et al., 2012).

2.8.1 Mecanismo da disfunção endotelial

Como apresentado anteriormente, o endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vasomotor através da síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras – tais como o óxido nítrico, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio – e pela liberação de substâncias vasoconstritoras – tais como a endotelina-1 e o fator de ativação plaquetária (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; NEVES et al., 2012; PERNOW; SHEMYAKIN; BÖHM, 2012).

O óxido nítrico, em situações fisiológicas, é um dos principais moduladores do tônus vasomotor, sendo continuamente secretado em pequenas quantidades pelas células endoteliais, assim, mantém o tônus arterial reduzido nas circulações sistêmica e pulmonar (VANHOUTTE et al., 1986; STAMLER et al., 1994; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Dessa maneira, o óxido nítrico inibe a adesão, a ativação e a agregação plaquetária e promove a desagregação plaquetária, em parte através de um mecanismo GMPc (Monofosfato cíclico de guanosina) dependente. Nas células musculares lisas, reduz a concentração intracelular de cálcio e causa relaxamento vascular (LOSCALZO et al., 1995; MAZZUCA; KHALIL; 2012).

A contribuição das células endoteliais para regulação do tônus vasomotor envolve, ainda, a produção de outros compostos vasodilatadores, que são a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (WEKSLER; MARCUS; JAFFE, 1977; ALVAREZ-MEDINA, HERNANDEZ, OROZCO, 2012).

Durante um processo inflamatório, o endotélio é capaz de expressar as chamadas moléculas de adesão (seletinas e integrinas), que permitem a ativação, o rolamento e a adesão de leucócitos à sua superfície. A oxidação da LDL, por exemplo, ativa a proteína-quinase C e um fator de transcrição nuclear (NF-kB) e

consequentemente leva ao aumento da transcrição de vários genes (enzima de conversão da angiotensina II, moléculas de adesão e citocinas). Neste contexto, a exacerbação desta resposta inflamatória e sua posterior cronicidade podem conduzir e/ou agravar a disfunção endotelial, propiciando eventos pró-coagulantes, diferenciação das células musculares lisas vasculares e macrófagos, dentre outros agravamentos (ZOTA; MELNIC; UNTESCO, 2008; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise fitoquímica, avaliar o potencial farmacológico e citotóxico de extratos hidroalcoólicos de *Hibiscus acetosella*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *H. acetosella* através de métodos cromatográficos (CCD – Cromatografia de Camada delgada e CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), e CCD para as frações do extrato.

- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *H. acetosella*, suas frações com diferentes concentrações, em cultura de células *in vitro* e determinar a concentração inibitória citotóxica 50% (IC₅₀).

- Analisar o efeito da administração de diferentes concentrações do extrato bruto de *H. acetosella* frente ao agente vasoconstritor e agente vasorrelaxante em modelo de disfunção endotelial.

- Correlacionar os estudos fitoquímicos e farmacológicos com os relatos de uso popular.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal para análise foram as folhas de *H. acetosella*, coletadas no Horto Florestal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e identificada pela botânica Dr^a. Vanilde Citadini Zanette. Após o processo de herborização, catalogação e exsiccagem, um exemplar foi adicionado ao acervo do Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da UNESC, com o número CRI 9735.

4.2 EXTRATOS

As folhas foram coletadas e encaminhadas à estufa, para secagem sob temperatura controlada entre 50-60 °C e, sendo trituras com auxílio de moedor de facas para obtenção de um pó fino.

O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir da metodologia de maceração. A partir dessa metodologia, a planta permaneceu 15 dias em contato com álcool 70%, na proporção de 1:10 (p/v). Após esse período, foi realizada a filtração do extrato e posteriormente evaporado o solvente com auxílio do rota-evaporador, formando um extrato mole (ANVISA, 2011).

4.2.1 Fracionamento líquido-líquido

Parte do extrato extrato mole foi reservado para testes farmacológicos, uma parte para testes toxicológicos e o restante foi suspenso em água na proporção 4,3 g:100 mL e posteriormente particionado com solventes de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Após o fracionamento, os solventes foram eliminados com auxílio de rota-evaporador para obtenção das frações secas (YUNES; CECHINEL FILHO, 2009).

4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD), visando uma análise fitoquímica preliminar, utilizando sistemas de eluentes e reveladores usuais para *screening* cromatográfico.

Para este procedimento foram utilizadas placas de cromatografia de sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) como fase estacionária, e diversos eluentes como fase móvel: Tolueno, acetato de etila, ácido fórmico, hexano, éter etílico, metanol e diclorometano.

Para revelar as classes de compostos foram utilizados reveladores universais como UV e ácido sulfúrico 10%, e reveladores específicos como: anisaldeído sulfúrico para terpenoides e esteroides que se apresentam em manchas coradas de rosa ou roxo; “reativo neu” para flavonoides e compostos fenólicos cujas manchas apresentam-se coloridas; Dragendorff para alcaloides através de cor laranja, entre outros (WAGNER; BLADT, 1996; UGAZ, 1994), conforme tabela 1.

Tabela 1 – Reveladores para CCD utilizados para identificação de metabólitos secundários

Revelador	Metodologia	Compostos evidenciados	Coloração das bandas
Anisaldeído sulfúrico	Pulverização por 5 minutos à 120°C	Terpenoide, esteroide e saponinas	Em luz visível: Marrom a rosa, Azul e roxo
Dragendorff	Pulverização	Alcaloide	Em luz visível: Laranja, vermelho a marrom
Neu	Pulverização por 2 minutos à 105°C	Flavonoide	Em luz visível: Amarelo e laranja UV 366 mm: Amarelo ou laranja
Ninidrina	Pulverização por 5-10 minutos à 100°C	Amina livre	Em luz visível: Marrom e púrpura

Fonte: Adaptado de WAGNER e BLADT (1996)

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas no Laboratório de Produtos naturais, sínteses e química medicinal (PNSCM) - UMR CNRS 6226 da “Université de Rennes 1” (França) utilizando Coluna Líquida Spherisorb ODS-2 C18 (150x4.6 mm, com tamanho de partícula 5 µm) (Waters Technology Ireland, Ltd., Wexford, Irlanda) protegida por filtro em linha, em sala com temperatura ajustada. A detecção dos picos cromatográficos foi realizada através de um detector de arranjo de diodos (DAD) (CLAE 540 DAD, Kontron instrumentos, Montigny Le Bretonneux, França), em 280 e 310 nm de espectro de absorção, com taxa de fluxo de 1 mL/min. Os picos foram registrados a cada segundo diretamente no CLAE. As fases móveis utilizadas para separação foram: (A) acetonitrila (ACN); (B) Ácido fosfórico (concentrado) (1%) / ácido acético (glacial) (10 %) / acetonitrila (5%) (v/v/v) em água, com pH ajustado a 1,4. O programa de eluição de gradiente linear foi executado como indicado: 0 min, 100% (B); 30 min, 70% (B); 40 min, 100% (A). Os solventes e as amostras foram filtrados através de filtro Millipore tipo HA de 0,45 µm. Os solventes utilizados para a separação eram de grau CLAE (GIUSTI et al., 1999).

Para essas análises, o extrato e frações de *H. acetosella*, preparados conforme descrito no item 4.2, foram solubilizados na concentração de 1 mg/mL de etanol absoluto, em temperatura ambiente, obtendo uma solução na proporção de 1 g/L. Os extratos foram agitados em vortex durante 10 minutos até diluição completa e foram filtrados com uma unidade de filtro de utilização única e injetados diretamente na quantidade de 20 µL.

4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.4.1 Cultura de células e tratamento

A análise citotóxica *in vitro* foi realizada com uma linhagem celular de melanoma de murinho, B16, e em uma linhagem celular humana sadia HaCaT (queratinócitos humanos), essas sendo uma linhagem não-cancerosa, semelhante à composição da derme humana. A linhagem celular B16 e HaCaT foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal bovino e 5µg/mL de penicilina/ estreptomicina.

Após 24 horas de incubação a 37°C sob 5% de dióxido de carbono para as células HaCaT e 10% para B16, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato e das frações de *H. acetosella* (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condições.

As soluções de extrato e frações de *H. acetosella* foram preparadas contendo DMSO quando insolúveis em água, sendo a quantidade deste solvente ajustada para dar uma concentração final inferior a 0,1%. Culturas-controle receberam apenas o veículo (MOSMANN, 1983; MAKHAFOLA; MCGAW; ELOFF, 2014).

4.4.2 Bioensaio MTT (viabilidade celular)

O ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado através de placas de 96 micropoços, onde foram adicionadas 1500 células por micropoço para a linhagem B16 e 1700 para a linhagem HaCaT. Estas foram incubadas a 37°C em ambiente com umidade controlada de 5-10% de CO₂ (Dióxido de carbono).

O controle positivo foi tratado com os quimioterápicos padrões Vincristina e Doxorrubicina, e os extratos em diferentes concentrações por 48 horas. Restando 3 horas para o término do tratamento 10 µL de MTT foram adicionados em cada micropoço e mantidos a 37°C. Após 3 horas, o sobrenadante foi removido e os cristais formados foram dissolvidos em 50 µL de DMSO.

A densidade óptica de cada amostra foi lida com o auxílio de leitor de microplacas em 540 nm. Cada experimento foi realizado em triplicata, em três ocasiões diferentes. Esse procedimento permitiu a determinação do IC₅₀ para cada um dos extratos testados a partir do processamento dos dados no software Biolise (MILLOT et al., 2007).

4.5 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

4.5.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 250 - 300g, com idade aproximada de nove semanas de vida, fornecidos pelo Biotério da UNESC. Os animais foram alojados em caixas plásticas com cama de maravalha e mantidos em ambiente com temperatura ideal de 20°C a 22°C, umidade relativa de 40% a 60% e ciclo-claro escuro de 12 horas cada, controlados automaticamente. Os animais receberam água e ração “*ad libitum*”. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UNESC) e cadastrado sob o número 80/2012 (BRASIL, 2008).

4.5.2 Procedimento para indução da disfunção endotelial em ratos

Na indução da disfunção endotelial por excesso de sal, os animais receberam dieta comercial (ração para roedores 0,3% de sal) ou dieta comercial com sobrecarga de sal (ração para roedores com 8% de NaCl – Cloreto de Sódio) durante cinco semanas. Os animais receberam água e dieta *ad libitum*.

4.5.3 Procedimentos para registro da pressão arterial em ratos

Após os tratamentos – cinco semanas – com indução da disfunção endotelial por excesso de sal (ou não, dependendo do grupo em questão) e a administração dos extratos (ou não, dependendo do grupo em questão), os animais foram anestesiados com uma mistura contendo cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg), administradas pela via intramuscular, com reforço de anestésico quando necessário (KOGA et al., 2008; SOUZA et al., 2011). A aferição da pressão arterial dos animais foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Óxido Nítrico da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Prof^o Dr^o Jamil Assreuy.

Os animais anestesiados foram fixados em decúbito dorsal, sobre uma mesa cirúrgica aquecida em torno de 35 e 36°C. A veia femoral foi dessecada para inserção de uma agulha que estava acoplada a uma cânula de polietileno e seringa, onde foram,

posteriormente, administrados os compostos (vasodilatador e constritor). Após a canulação da veia, foi administrado heparina sódica 30UI (5000UI), diluída em 100µL de solução salina. Após localização da artéria carótida, foi separado o nervo vago dos tecidos adjacentes e o fluxo da artéria carótida foi interrompido na extremidade distal por uma ligadura com fio de sutura e o fluxo da extremidade proximal foi suprimido pela compressão de uma pinça curva. Logo após, com uma tesoura foi realizado um corte na região medial da porção da artéria carótida para inserção de um cateter de polietileno heparinizado, este foi amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão arterial (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, TX, USA) interligado a um equipamento de análise de pressão Powerlab 8/30 (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Para facilitar a respiração espontânea os animais foram submetidos à traqueostomia, quando necessário. Após 30 minutos, tempo necessário para estabilização da pressão arterial, a mesma foi verificada (KOGA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Para continuação do estudo, com finalidade de verificar o comportamento da pressão arterial dos animais frente à administração aguda de fármacos vasodilatador e vasoconstritor, foi feita administração de fenilefrina em doses crescentes (3, 10 e 30 nmol/kg). Após recuperação dos parâmetros de pressão basal, foi administrada acetilcolina em doses crescentes (3, 10 e 30 nmol/kg). Foi verificada a pressão arterial dos animais para obtenção de uma curva concentração resposta de vasodilatação e vasoconstrição no mesmo animal, objetivando verificar o comportamento da pressão arterial dos animais quando administrados os fármacos, respeitando volumes administrados, para que a administração dos mesmos não interferisse *per se* na pressão do animal (uma vez que o volume sanguíneo também é fator determinante da pressão arterial) (KOGA et al., 2008; SOUZA et al., 2011). Imediatamente ao final do experimento, os animais passaram por procedimento de eutanásia em câmara de CO₂.

4.5.3.1 Protocolos experimentais

A indução da disfunção endotelial foi conforme descrito acima no item 4.5.2. Após o período de tratamento (cinco semanas), os animais foram avaliados quanto à pressão arterial seguindo o descrito em 4.5.3. Os grupos foram divididos conforme descrito a seguir (KOGA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

4.5.3.1.1 Avaliação da pressão arterial em animais do grupo controle

Os animais do grupo controle negativo foram tratados com dieta comercial (ração para roedores 0,3% de sal) e água (via oral) por cinco semanas, e posteriormente foram anestesiados e preparados para o registro direto da pressão arterial como descrito no item 4.5.3.

4.5.3.1.2 Avaliação da pressão arterial em animais submetidos à dieta hipersódica

Após o período de tratamento com dieta hipersódica conforme descrito no item 4.5.2, e posteriormente os animais foram anestesiados e preparados para o registro direto da pressão arterial como descrito no item 4.5.3.

4.5.3.1.3 Avaliação da pressão arterial em animais submetidos à dieta hipersódica juntamente com uso de anti-hipertensivo padrão

Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com dieta hipersódica conforme descrito no item 4.5.2. Concomitantemente, foi realizada a administração de anti-hipertensivo padrão (Captopril 50 mg/kg) por via oral, por cinco semanas, e posteriormente foram anestesiados e preparados para o registro direto da pressão arterial como descrito no item 4.5.3.

*4.5.3.1.4 Avaliação dos efeitos de *H. acetosella* em animais submetidos à dieta hipersódica*

Os animais foram tratados com dieta hipersódica conforme descrito no item 4.5.2. Concomitantemente, foi realizada a administração do extrato de *H. acetosella* nas doses de 50, 100 ou 250 mg/kg, por via oral (gavagem), por um período de cinco semanas. Posteriormente, os animais foram anestesiados e preparados para o registro direto da pressão arterial como descrito no item 4.5.3.

Tabela 2 – Tabela explicativa do protocolo experimental.

Grupos	Tratamento (dose)	Ração (%NaCl)
Controle negativo	Salina	Ração 0,3%
Excesso de sal	Salina	Ração 8%
Anti-hipertensivo padrão	Captopril 50 mg/kg via oral	Ração 8%
Excesso de sal + <i>H. acetosella</i> 50mg	Extrato de <i>H. acetosella</i> 50 mg/kg via oral	Ração 8%
Excesso de sal + <i>H. acetosella</i> 100mg	Extrato de <i>H. acetosella</i> 100 mg/kg via oral	Ração 8%
Excesso de sal + <i>H. acetosella</i> 250mg	Extrato de <i>H. acetosella</i> 250 mg/kg via oral	Ração 8%

Fonte: O autor (2014)

4.5.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) por grupo. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA). Após, testes *post hoc* foram necessários para determinação das diferenças estatísticas. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. As análises foram realizadas com pacote estatístico GraphPad Prism 5.0.

5 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

H. acetosella apresenta importância na medicina popular, uma vez que esta espécie é utilizada pela população para diversas finalidades, principalmente na região do sul de Santa Catarina. Segundo relatos da Pastoral de Saúde Regional Sul IV (ROSSATO; CHAVES, 2012), de Criciúma, suas folhas são utilizadas em forma de salada, de chás e sucos para melhorar o desempenho físico e mental, anemia, ansiedade e angústia; usado também para minimizar os efeitos associadas à menopausa, andropausa e hipertensão arterial.

Até o momento foram publicados poucos estudos em literatura científica relacionados a *H. acetosella*. Tsumbu e colaboradores (2012) realizaram estudos com extrato dessa espécie com o objetivo de avaliar a ação antioxidante e anti-inflamatória. Foram utilizados modelos de lipoperoxidação e PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), em neutrófilos, especialmente MPO (Mieloperoxidase). O extrato de *H. acetosella* exerceu um efeito inibitório de EROs dose dependente, uma vez que continha maior quantidade de polifenóis totais, ácidos fenólicos e flavonoides durante a análise CLAE-UV/DAD. Os dados evidenciaram a importância de novos estudos quanto ao perfil dos compostos antioxidantes presentes nesta espécie.

No presente estudo, o particionamento do extrato hidroalcoólico resultou em maior rendimento em massa quando utilizado o solvente *n*-butanol, conforme mostra tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento do fracionamento líquido-líquido realizado com 8,6 g de extrato mole hidroalcoólico 70%.

Frações	Rendimento
Acetato de etila	0,483 g / 5,6%
<i>n</i> -Butanol	0,945 g / 11%
Diclorometano	0,673 g / 7,82 %

Fonte: O autor (2014)

Após o processo de fracionamento e obtenção das frações secas, as amostras foram submetidas à procedimentos de investigação fitoquímica através de análises cromatográficas.

O perfil cromatográfico (CCD) das três frações de partição líquido-líquido se diferenciou tanto na coloração como no fator de retenção (R_f) dos compostos químicos.

Quando o extrato bruto e as frações de diclorometano e acetato de etila, foram avaliadas pela fase móvel hexano:éter etílico:ácido fórmico (65:40:10) e reveladas com anisaldeído observou-se a presença de bandas na coloração violeta, o que sugere a presença de compostos terpênicos, esteroidais ou saponínicos. Apesar de esses compostos apresentarem a característica polar. As saponinas são caracterizadas principalmente por sua capacidade espumígena, que foi constatada durante o preparo das amostras da fração do diclorometano. Outras espécies do mesmo gênero apresentam estes grupamentos de metabólitos, podendo citar *Hibiscus tiliaceus* (CHENG et al., 2013).

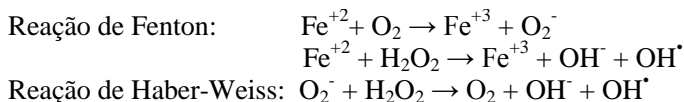
Foi visualizada uma banda fluorescente azulada, em UV 365 nm, durante a análise com revelador Neu, indicando a presença de composto fenólicos simples, no extrato bruto, nas frações butanólica e de acetato de etila. Não foram constatados indícios da presença de compostos alcaloidínicos em nenhuma das frações avaliadas na espécie de *H. acetosella*, com utilização do revelador dragendorff. Estes resultados corroboram com os dados publicados por Tsumbu e colaboradores (2012) que relatam a presença de polifenóis, flavonoides e taninos nesta espécie.

Foram realizadas outras migrações cromatográficas utilizando tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (139:83:8), como fase móvel. As bandas obtidas foram semelhantes às encontradas com a primeira composição de fase móvel.

A revisão da literatura revelou que outras espécies do mesmo gênero - *Hibiscus* - são ricas em compostos fenólicos e flavonoides (RAMIREZ-RODRIGUES et al., 2011).

Os benefícios à saúde dos flavonoides são bem conhecidos. Diversos estudos mostraram que polifenóis possuem ação protetora contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes Mellitus, e diversos tipos de tumores em humanos (FRAGA et al., 2010; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). A presença de polifenóis na dieta diminui a absorção excessiva de metais (como Fe e Cu) e protege contra os danos oxidativos a eles associados (HALLIWELL, 2007; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011). Sabe-se que o ferro catalisa reações de produção de radicais livres, podendo assim ser prejudicial ao organismo. As reações de Fenton e de Haber-Weiss mostram o papel do ferro no metabolismo dos

radicais livres. A reação de Haber-Weiss é catalisada principalmente pelo ferro, enquanto na reação de Fenton o ferro participa como reagente (GOLDSTEIN; MEYERSTEIN; CZAPSKI, 1993; KOPPENOL, 2001), conforme mostrado a seguir:



Alguns estudos demonstraram que o uso de extrato contendo polifenóis apresentam atividade coronária (RENAUD; De LORGERIL, 1992; DUBICK; OMAJE, 2001; NARDINI; NATELLA; SCACCINI, 2007; FRAGA et al., 2010; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). Os polifenóis são inibidores potentes da oxidação de LDL, por atuarem como antioxidantes eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Sabe-se que este tipo de oxidação é considerada um mecanismo fundamental no desenvolvimento da aterosclerose (AVIRAM et al., 2000; FRAGA et al., 2010; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). Outros mecanismos pelos quais os polifenóis atuam na proteção contra as doenças cardiovasculares são antioxidante, antiplaquetários, anti-inflamatórios, bem como, apresentam ação de elevar os níveis de HDL (Lipoproteína de alta densidade) e melhoria da função endotelial (AVIRAM et al., 2000; NARDINI; NATELLA; SCACCINI, 2007; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; FRAGA et al., 2010; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013).

Após as frações serem submetidas à análise cromatográfica utilizando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em diferentes sistemas de eluentes, foi escolhido metanol:diclorometano:ácido fórmico (10:90:1) como o sistema que apresentou melhor resolução das bandas nas placas cromatográficas.

Este trabalho utilizou CLAE para identificação dos compostos presentes nas folhas de *H. acetosella*, visto que é uma técnica amplamente utilizada na área de produtos naturais, tanto no isolamento dos metabólitos secundários em extratos vegetais, como na identificação e quantificação desses compostos isolados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; MARCO; POPPI; SCARMINIO, 2008; MALDANER; JARDIM, 2009). Foram analisados o extrato bruto e as três frações da espécie, como se pode verificar nas figuras 2, 3, 4 e 5. Os picos que apresentaram

similaridade com relação aos parâmetros monitorados foram numerados.

Figura 2 – Perfil cromatográfico dos padrões, analisados em CLAE/DAD em 280 nm, utilizando o programas de gradiente otimizado, conforme descrito no item 4.3.1.

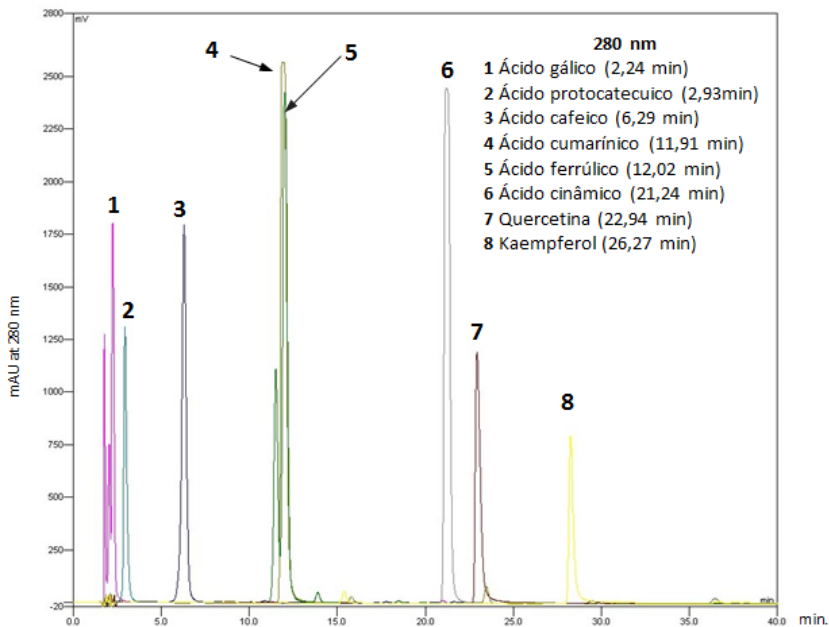


Figura 3 – Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas secas de *H. acetosella*, analisado em CLAE/DAD em 280 nm, utilizando o programa de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1, e abaixo pode ser visto o perfil UV do composto 3 (tR: Tempo de retenção).

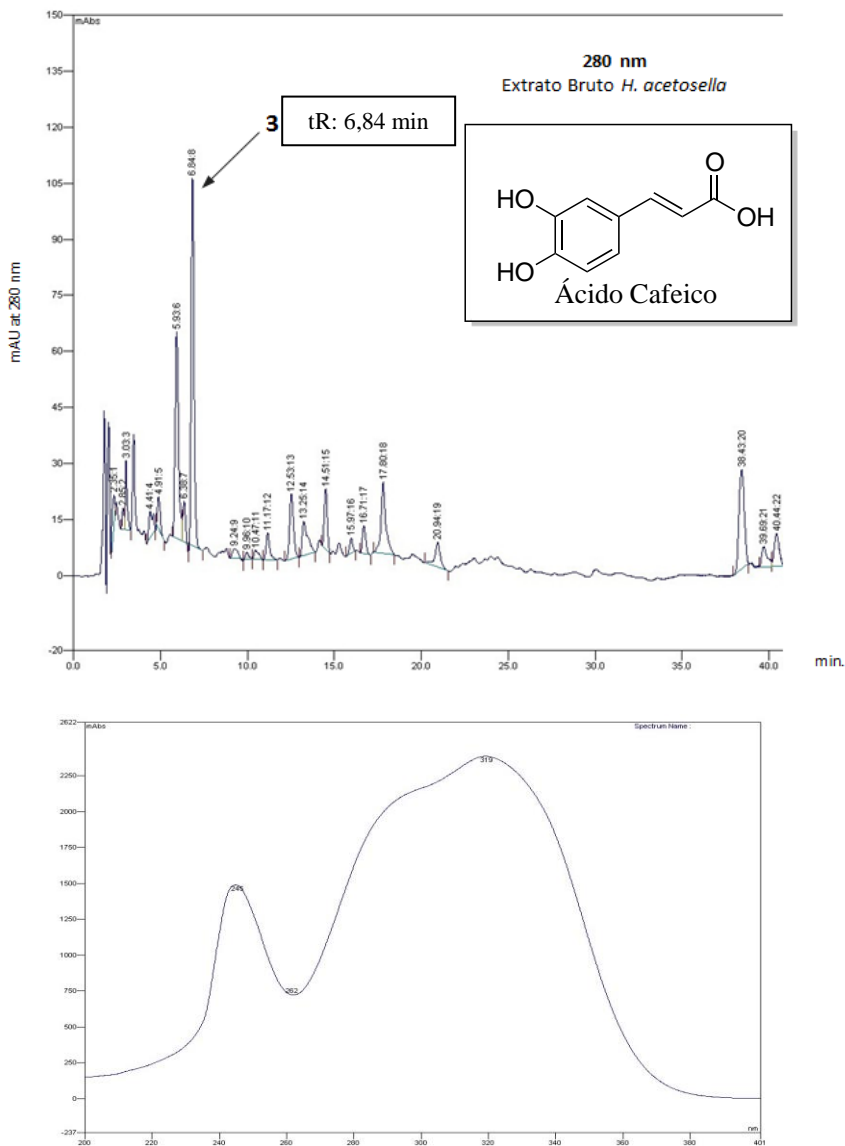


Figura 4 – Perfil cromatográfico dos padrões, analisados em CLAE/DAD em 310 nm, utilizando o programas de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.

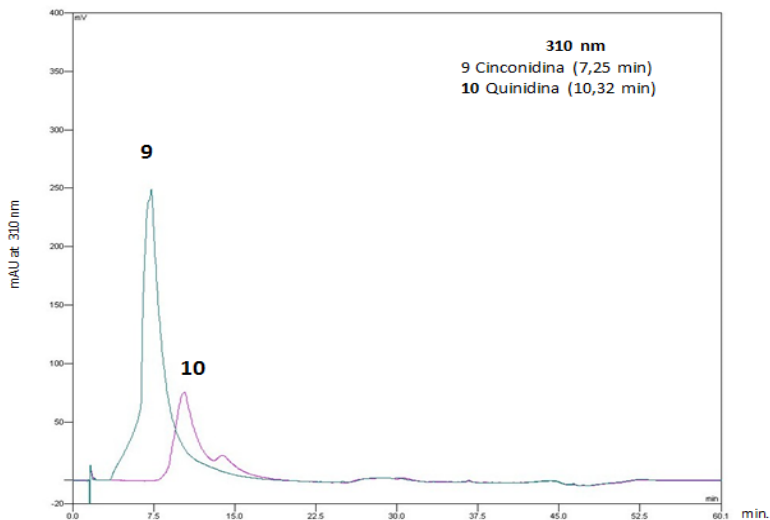
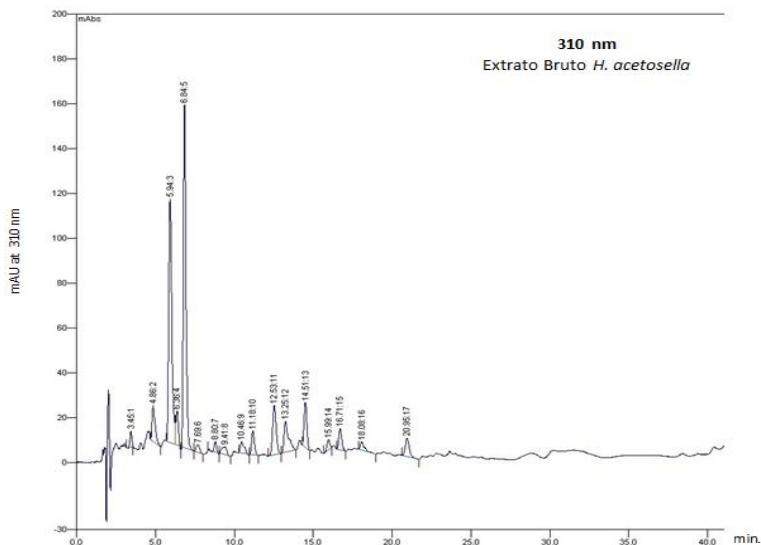


Figura 5 – Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas secas de *H. acetosella*, analisado em CLAE/DAD em 310nm, utilizando o programa de gradiente otimizado conforme descrito no item 4.3.1.



Os resultados do perfil do extrato bruto das folhas de *H. acetosella* mostrou picos cromatográficos no tempo de retenção entre 0 a 40 minutos. Ao analisar a figura 3, no comprimento de onda de 280 nm, no tempo de retenção de 6,84 minutos, pôde-se observar a presença do pico 3, identificado como sendo o composto fenólico ácido caféico ($C_9H_8O_4$), quando comparado com os tempos de retenção com os de padrões autênticos (figura 2). Além de constatar a presença de compostos polifenólicos (ácido cafeico), pôde-se verificar a presença de flavonoides e saponinas, por CCD. Tsumbu e colaboradores (2012) isolaram, ainda, os seguintes compostos: ácido clorogênico, rutina, hiperosídeo e ácido rosmarínico.

O Ácido Cafeico foi identificado como metabólito secundário presente em *H. Acetosella* e segundo dados de literatura mostram que derivados do ácido cafeico apresentam propriedades biológicas e farmacológicas, tais como antioxidantes (OZEN et al., 2004; OZYURT et al., 2004), anti-inflamatórios (KROL et al., 1996; MICHALUART et al., 1999), anticancerígeno (LEE et al., 2000; CHEN; SHIAO; WANG, 2001; BORRELLI et al., 2002) e imunomoduladores (PARK; KAHNG, 1999), atividades semelhantes aos flavonoides, além de influenciar na alteração da frequência cardíaca e da pressão arterial (LI et al., 2005).

Derivados do ácido cafeico demonstraram ser benéfico em doenças cardiovasculares e para ter um efeito hipotensor em ratos espontaneamente hipertensos (NATARAJAN et al., 1996; ILHAN et al., 1999; MAFFIA et al., 2002). Essa abordagem será aprofundado no item 5.3, quando será correlacionado com os resultados obtidos nos testes farmacológicos realizados *in vivo*.

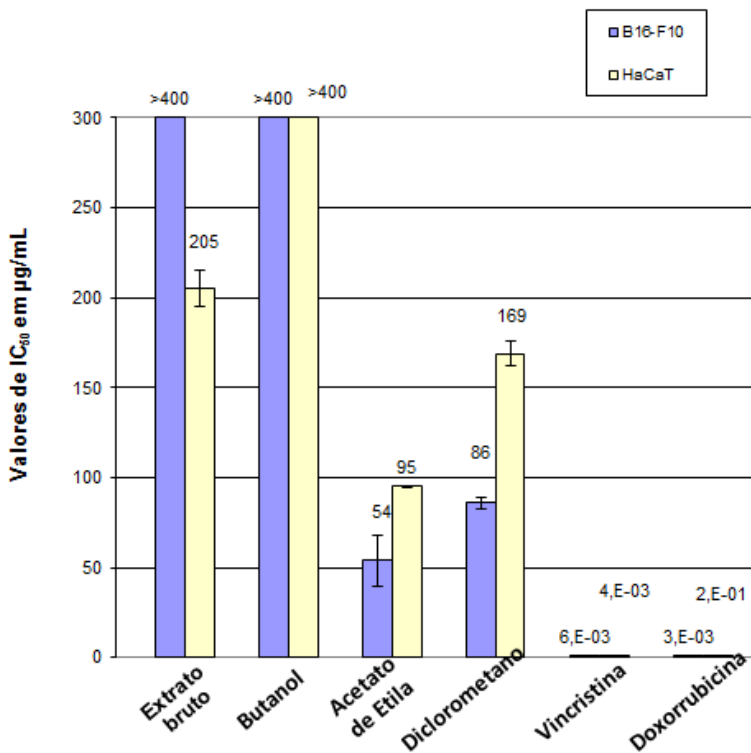
5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

A cultura de células é uma ferramenta valiosa para a investigação do funcionamento celular, pois consiste na manutenção e multiplicação *in vitro* de células vivas possibilitando a análise do metabolismo e do comportamento celular frente a um componente a ser testado (EISENBRAND et al., 2002). Essa avaliação é de fundamental importância, pois muitos compostos presentes nas plantas possuem atividade tóxica que podem causar danos celulares.

Revisando em literatura, foram encontrados poucos trabalhos científicos que tenham avaliado a potencial atividade tóxica do extrato de *H. acetosella* sobre células (TSUMBU et al., 2011; TSUMBU et al., 2012). Assim, para verificar a citotoxicidade do

extrato hidroalcoólico e das respectivas frações de *H. acetosella*, foi realizado o experimento *in vitro* com duas linhagens de células: HaCaT (queratinócitos humanos saudáveis) e B16 (melanócitos de murinos). Os resultados estão apresentados na figura 6.

Figura 6 – Citotoxicidade das frações de *H. acetosella* frente às linhagens celulares testadas, conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2.



Os resultados encontrados podem ser estratificados em dois tipos de amostras, $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$: Extrato bruto e fração butanólica, se mostrando, assim, sem citotoxicidade; e amostras com IC_{50} entre 25 e $200 \mu\text{g/mL}$: fração de acetato de etila e fração de diclorometano, com citotoxicidade moderada.

Neste estudo, foram adotados os critérios segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (USNCI), no qual, o programa de triagem de plantas estabelece que, um extrato vegetal bruto, para ser considerado citotóxico, deve apresentar IC_{50} , após

incubação de 48 a 72 horas, menor que 20 µg/mL, ou 4µg/mL em caso de compostos puros (GERAN et al., 1972).

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se constatar que o extrato e as frações testadas de *H. acetosella* não mostraram atividade citotóxica significativa para as linhagens testadas. Verificou-se, ainda, maior atuação sobre as células de melanócitos quando comparada às células saudáveis, com exceção do extrato bruto.

Os resultados obtidos corroboram os descritos por Tsumbu e colaboradores (2011; 2012), sendo que foram utilizados modelos distintos para verificação de viabilidade celular em *H. acetosella*.

Alguns estudos com animais avaliando outra espécie de *Hibiscus* (*H. sabdariffa*) sugerem que esta espécie possui baixo grau de toxicidade aguda com a dose letal média (DL₅₀) que varia de 2000 a mais de 5000 mg/kg (FAKEYE et al., 2009; NDU et al., 2011). Em contraste, foi demonstrado que mostrou que doses tão altas como 4600 mg/kg pode ser administrada por vários meses em um modelo animal sem relatos de mortalidade, embora tenham sido encontrados efeitos negativos sobre testículos e contagem de espermatozoides (ORISAKWE; HUSAINI; AFONNE, 2004). A variação destes resultados pode ser devido ao tipo de solventes usados para a extração, o método e duração de administração e da variedade da espécie utilizada (FAKEYE et al., 2009).

A determinação da citotoxicidade é uma fase essencial para garantir o uso seguro. Estes resultados sugerem que o uso de *H. acetosella* não possui efeitos citotóxicos, no entanto, outros estudos toxicológicos são necessários para confirmar o uso seguro desta planta medicinal.

5.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

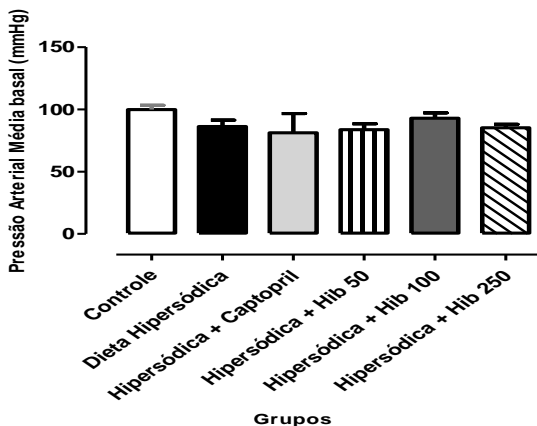
Por *H. acetosella* ser utilizada pela população da região e possuir compostos químicos importantes na área farmacológica, primeiramente foram realizados estudos fitoquímicos para analisar os compostos do metabolismo secundário presente nesta espécie. Outras espécies de *Hibiscus* foram mais estudadas e estas apresentam efeito diurético e anti-hipertensivo, como por exemplo, *Hibiscus sabdariffa*, que é utilizada popularmente com esta finalidade e já existem estudos que indicam a possível atuação de determinados compostos químicos que atuam na enzima conversora de angiotensina (ECA) (HERRERA-ARELLANO et al., 2004;

HERRERA-ARELLANO et al., 2007; OJEDA et al., 2010; TIRAPELLI et al., 2010).

Para análise farmacológica do extrato de *H. acetosella*, foi reproduzido um modelo de hipertensão já descrito em literatura, que consistiu em alimentar os animais com ração hipersódica (8% de NaCl na ração para roedores (KOGA et al., 2008, SOUZA et al., 2011).

Apesar de ser um modelo bem aceito e amplamente utilizado, segundo outras literaturas é um modelo de difícil reprodução, podendo ser necessário o tratamento por um período de tempo maior do que cinco semanas. Morizane e colaboradores (2012) e Susic e colaboradores (2010), relatam que o animal pode continuar apresentando dados pressóricos basais semelhantes aos de um animal normotenso, o que indica que o mesmo não apresenta hipertensão. A Figura 7 demonstra que os animais do grupo que recebeu apenas dieta hipersódica, quando comparados com o grupo controle, não apresentaram pressão arterial elevada, assim como os outros grupos que também apresentaram pressão arterial basal semelhante ao controle, não havendo diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos.

Figura 7 – Pressão arterial média de ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, tratados ou não com *H. acetosella*. Os animais tratados com captopril fazem parte do grupo controle positivo. Cada barra representa um número de 4 a 10 animais. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via. Os dados foram avaliados no programa GraphPad Prism 5.



Segundo Neves e colaboradores (2012), independentemente do modelo de hipertensão, geralmente a disfunção endotelial desenvolve-se em animais hipertensos, onde o aumento de espécies reativas de oxigênio, hiperatividade do sistema renina angiotensina, endotelina, ativação simpática e inflamação podem contribuir para o estresse oxidativo e no mecanismo da disfunção endotelial.

Sabe-se que o endotélio vascular exerce controle da homeostase cardiovascular, através da atividade regulatória de mediadores vasodilatadores e vasoconstritores sobre o endotélio. Quando ocorre desequilíbrio nestes mecanismos ou os mesmos são afetados, podem gerar um quadro hipertensivo ou somente uma disfunção endotelial, que é caracterizada pela diminuição da vasodilatação endotélio-dependente (SCHACHINGER; BRITTEN; ZEIHNER, 2000; WIDLANSKY et al., 2003; NEVES et al., 2012). Alterações na estrutura do endotélio vascular que resultam em aumento da resistência, ou ainda, em espessamento estrutural permanente dos vasos, aumentam a reatividade vascular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

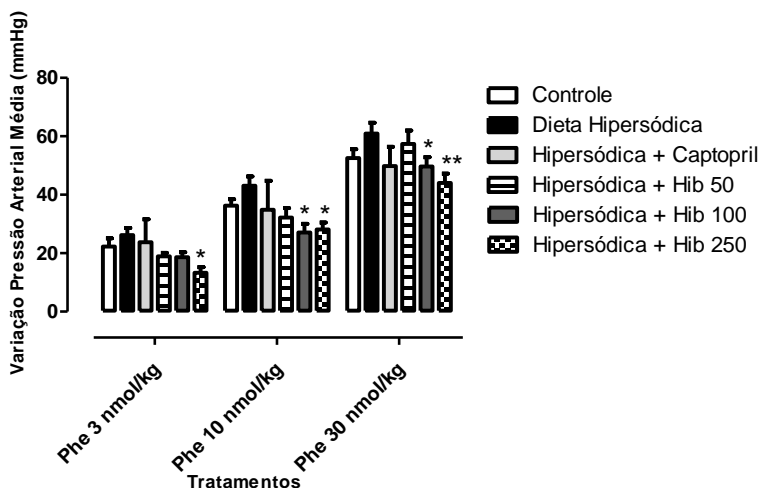
Alguns estudos com plantas medicinais descrevem que extratos podem ter ação nas artérias coronária e os polifenóis são associados a esse efeito de relaxamento do endotélio-dependente (KIM et al., 2013).

No presente estudo, foi possível observar a reatividade do endotélio vascular frente à administração de fármaco com ação de vasoconstrição e vasodilatação. Para realizar a análise da função endotelial, o método mais empregado, em estudos clínicos, tem sido a avaliação da resposta vasomotora dependente do endotélio de artérias de condução e de vasos de resistência a estímulos farmacológicos ou a modificações no fluxo sanguíneo. O vasodilator de escolha tem sido a acetilcolina, visto que a ação direta nas células endoteliais, associada ao aumento de fluxo, leva à produção e liberação de óxido nítrico, causando redução do tônus e vasodilatação (TOUSOULIS; DAVIES; CRAKE, 1998; RODRIGUES et al., 2010). E, como vasoconstritor, o fármaco de escolha é a fenilefrina (ROSSONI et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2006; RODRIGUES, et al., 2014).

Observando a Figura 8, quando administrado fenilefrina, pôde-se constatar que a dieta com excesso de sal causou disfunção endotelial maior nos vasos dos animais do grupo com dieta hipersódica, quando comparado com o grupo controle. O grupo que recebeu dieta hipersódica apresentou uma resposta mais intensa à

fenilefrina, o que representou uma vasoconstrição mais intensa e por um período de tempo maior nesses animais. É importante ressaltar que alguns animais não retornaram à pressão basal após sua atuação no organismo, indicando que a sensibilidade do endotélio dos animais hipertensos estava alterada.

Figura 8 – Alteração da pressão arterial média em resposta à fenilefrina (Phe 3 nmol/kg – 30 nmol/kg) em ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, que receberam ou não tratamento com *H. acetosella*. Os animais tratados com captopril fazem parte do grupo controle positivo. Cada barra representa um número de 4 a 10 animais. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os dados foram avaliados no programa GraphPad Prism 5.0.



Conforme representado na Figura 8, quando administrado as três doses de fenilefrina, o grupo que recebeu dieta hipersódica e foi tratado com *H. acetosella* 250 mg/kg apresentou efeito protetor sobre a disfunção endotelial provocada pelo excesso de sal, quando comparado com o grupo que recebeu apenas dieta hipersódica. Na dose de fenilefrina 10 nmol/kg e 30 nmol/kg, o tratamento com dose de 100mg/kg de extrato de *H. acetosella* também foi capaz de proteger o endotélio vascular, como apresentado na Figura 8. O efeito protetor de *H. acetosella*, pode ser explicado pelo fato desta

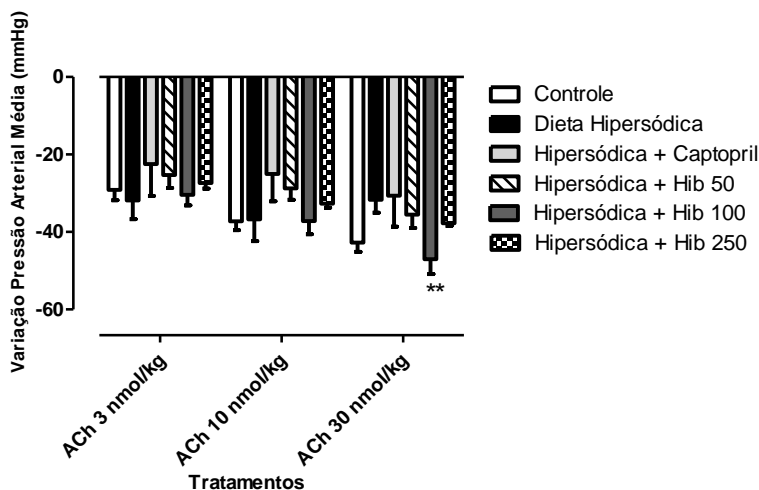
planta apresentar compostos antioxidantes, como polifenóis, ácido cafeico e flavonoides, e ainda saponinas como demonstrado nos estudos fitoquímicos (OZEN et al., 2004; KIM et al., 2013).

Alguns estudos relataram anteriormente que derivados do ácido cafeico induzem hipotensão imediata dosagem-dependente e leva a diminuição da frequência cardíaca. Ozen e colaboradores (2004), durante experimento *in vivo*, relataram os efeitos hipotensores e bradicárdicas do CAPE (Éster Fenetílico Ácido Cafeico) em ratos. Esse derivado cafeico pode afetar o sistema NO (óxido nítrico) e também inibir a peroxidação lipídica, tendo capacidade de prevenir a oxidação de componentes intracelulares importantes.

Estudos epidemiológicos examinaram a relação entre a ingestão de polifenóis a partir do consumo de alimentos (frutas, legumes, chá, vinho) e a prevenção de doenças crônicas, incluindo um efeito protetor sobre as doenças cardiovasculares. De acordo com estes, evidências apoiam que a ingestão de flavonoides apresenta efeitos sobre a pressão arterial, perfil lipídico, atividade plaquetária, a sensibilidade à insulina, cognitivo função, inflamação e estresse oxidativo (GRASSI; FERRI, 2014). Outros estudos mais específicos relacionados aos flavonoides e em especial a quercetina relatam que estes exercem efeitos vasodilatadores independente do endotélio, ação protetora sobre o óxido nítrico e a função endotelial em condições de estresse oxidativo (MULVIHILL; HUFF, 2010; HE et al., 2012).

Ao administrarmos a acetilcolina, agente vasodilatador, pode-se observar (Figura 9), que em sua concentração máxima testada (30 nmol/kg), a vasodilatação do grupo de animais tratados com *H. acetosella* na concentração de 100mg/kg foi mais significativa.

Figura 9 – Alteração da pressão arterial média em resposta à acetilcolina (ACh 3 nmol/kg – 30 nmol/kg) em ratos que receberam ração normal (controle) ou ração hipersódica, que receberam ou não tratamento com *H. acetosella*. Os animais tratados com captopril fazem parte do grupo controle positivo. Cada barra representa um número de 4 a 10 animais. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os dados foram avaliados no programa GraphPad Prism 5.0.



A figura 9 mostra *H. acetosella* apresentando ligeira proteção sobre a vasodilatação induzida pela acetilcolina, em especial na dose de 100 mg/kg do extrato, quando comparado com o grupo que recebeu dieta hipersódica mas não foi tratado com extrato da planta. Segundo Kumar, Abbas e Fausto (2010) e Neves e colaboradores (2012) a disfunção endotelial ocorre antes das manifestações das doenças vasculares que, quando presente, provoca diminuição da vasodilatação mediada pelo aumento do fluxo e, consequentemente, vasoconstrição após infusão de acetilcolina. Na hipertensão sensível ao sal, a redução da vasodilatação dependente do endotélio ocorre devido à diminuição da responsividade das células musculares lisas vasculares ao óxido nítrico e a diminuição da produção de NO (DICKINSON et al., 2014). Sendo assim, o comprometimento da vasodilatação, mediado pela acetilcolina

diminuída no grupo hipertenso, é justificada pelas alterações celulares que o excesso de sal causa no endotélio.

Em suma, extrato bruto de *H. acetosella* preveniu danos endoteliais, melhorando a resposta do vaso, quando administrado agente vasodilatador e vasoconstritor, mostrando um potencial efeito protetor sobre o sistema cardiovascular.

6 CONCLUSÃO

- As análises cromatográficas (CCD e CLAE) no extrato hidroalcoólico das folhas de *H. acetosella* detectaram compostos polifenólicos, como flavonoides, ácido cafeico e saponinas.

- Os resultados encontrados de IC₅₀ do extrato bruto foram superiores a 400 µg/mL para linhagem B16 e 205 µg/mL para HaCaT. Para a fração butanólica, o IC₅₀ foi superior 400 µg/mL para ambas as linhagens. Para fração de acetato de etila, o IC₅₀ foi 54 µg/mL para B16 e 95 µg/mL para HaCaT e para fração de diclorometano, o IC₅₀ foi 86 µg/mL para B16 e 169 µg/mL para HaCaT.

- Modelo animal utilizado mostrou que o excesso de sal causou disfunção endotelial.

- O grupo de animais com disfunção endotelial que foram tratados com extrato bruto de *H. acetosella* nas doses de 100 mg/kg e 250 mg/kg apresentaram menor resposta vasoconstritora e resposta vasorrelaxante mais intensa.

- O extrato bruto de *H. acetosella* mostra que pode apresentar efeito cardioprotetor principalmente no que se refere à proteção do endotélio vascular.

- Pode-se associar a presença dos compostos secundários detectados em *H. acetosella* com a atividade biológica cardiovascular relatada pela população.

7 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / ANVISA**. Brasília: ANVISA, 2011.

AJAY, M. et al. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 388-393, Fev. 2007.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALQASOUMI, S.I. ‘Okra’ *Hibiscus esculentus* L.: A study of its hepatoprotective activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 2, p. 135-141, Abr. 2012.

ALVAREZ-MEDINA, D. I.; HERNANDEZ, A.; OROZCO, C. Endothelial hyperpolarizing factor increases acetylcholine-induced vasodilatation in pulmonary hypertensive broilers arterial rings. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 1, p. 1-6, Fev. 2012.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.

ANDRADE, J. M. M.; FASOLO, D. Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and contribution to Health Promotion. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Org.). **Polyphenols in Human Health and Disease**, 1. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 253-265.

AVIRAM, M. et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1062-1076, Maio 2000.

BALICK, M.J.; COX, P.A. Ethnobotanical Research and Traditional Health Care in Developing Countries. In: BODEKER, G. et al (Org.). **Medicinal Plants for Forest Conservation and Health**

Care. Rome: Food and Agriculture Organization of the United National, 1997. p. 12-23.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, Abr. 2009.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, 2. ed. Viçosa: UFV, 1991.

BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia**: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: Museu paraense Emílio Goeldi, 1993.

BORRELLI, F. et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. S38-S43, Nov. 2002.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Lex**: Diário Oficial da União. Seção 1, p. 1, Brasília, Maio 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Lex**: Diário Oficial [da] República federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.

BRASILEIRO, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no Programa de Saúde da Família, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, Out./Dez. 2008.

BREITBACH, U. B.. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180-189, Maio 2013.

BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121-140, Set. 2011.

CAVEROA, R.Y.; AKERRETA, S.; CALVO, M. I. Medicinal plants used for dermatological affections in Navarra and their pharmacological validation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 533-542, Set. 2013.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, Y. J.; SHIAO, M. S.; WANG, S. Y. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 2, p. 143-149, Fev. 2001.

CHENG, C. L. et al. Tetracyclic triterpenoids isolated from semi-mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 12, p. 1080-1082, Dez. 2013.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805-817, 12 Dez. 2013.

COSTA, A.S.G. et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 324-328, Dez. 2012.

COWEN, D. L.; HELFAND, W. H. **Pharmacy**: An illustrated history. New York: Harry N. Abrams Inc, 1990.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, p. 1285-1295, 2007.

DHAMI, N. Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 4, p. 123-131, Dez. 2013.

DICKINSON, K M. et al. Postprandial effects of a high salt meal on serum sodium, arterial stiffness, markers of nitric oxide production and markers of endothelial function. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 211-216, Jan. 2014.

DIEGUES, A. C et al. **Os saberes tradicionais e a biodiversidade no Brasil**. São Paulo: MMA/COBIO/NUPAUB/USP, 2000.

DOS SANTOS, L. et al. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. **Life Sciences**, v. 78, n 19, p. 2272-227, Abr. 2006.

DOS SANTOS MONTAGNER, G. F. F. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1410-1416, Ago. 2010.

DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T. Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans. **Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods**, v. 3, n. 3, p. 67-93, Jan. 2001.

DUTRA, R. C. et al. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 429-435, Abr./Jun. 2009.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, Fev. 2002.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, n. 1-3, p. 235-239, Abr. 1991.

ETKIN, N. L.; ELISABETSKY, E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: The future of ethnopharmacology.

Journal of Ethnopharmacology, v. 100, n. 1–2, p. 23–26, Ago. 2005.

FAKEYE, T. O. et al. Toxic effects of oral administration of extracts of dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae).

Phytotherapy Research, v. 23, n. 3, p. 412–416, Mar. 2009.

FRAGA, C. G. et al. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435–445, Dez. 2010.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, Set. 2009.

GERAN, R. I. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumour and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 3, n. 1, p. 17–19, 1972.

GIUSTI, M. M. et al. Eletrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4657–4664, Dez. 1999.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 4, p. 435–445, 1993.

GRASSI, D.; FERRI, C. Cocoa, Flavonoids and Cardiovascular Protection. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Org.). **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 2, San Diego: Academic Press, 2014. p. 1009–1023.

GRAZ, B.; FALQUET, J.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology, sustainable development and cooperation: The importance of gathering clinical data during field surveys. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 635–638, Ago. 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, Fev. 2006.

HALBERSTEIN, R. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, Out. 2005.

HALLIWELL B. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 341-347, Jan. 2007.

HANAZAKI, N. Etnobotânica e conservação: manejar processos naturais ou manejar interesses opostos? In: Mariath, J.E.A.; Santos, R.P. (Org.). **Os avanços da botânica no início do século XXI: Morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética**. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 2006. p. 485-488.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, Abr. 2005.

HE, D et al. Total flavonoids of *Flos Chrysanthemi* protect arterial endothelial cells against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 68-73, Jan. 2012.

HEINRICH, M. Ethnopharmacy and natural product research - Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n. 1, p. 1-5, Abr. 2008.

HERRERA-ARELLANO, A. et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, Lisinopril-controlled clinical trial. **Planta Medica**, v. 73, n. 1, p. 6-12, Jan. 2007.

HERRERA-ARELLANO, A. et al. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 375-382, Jul. 2004.

HEYWOOD, V. H. Ethnopharmacology, food production, nutrition and biodiversity conservation: Towards a sustainable future for indigenous peoples. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 1-15, Set. 2011.

HOPKINS, A. L. et al. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. **Fitoterapia**, v. 85, n. 13, p. 84-94, Mar. 2013.

ILHAN, A. et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. **European Journal Cardio-Thoracic Surgery**, v. 16, n. 4, p. 458-463, Out. 1999.

JOANNIDES, R.; BELLIN, J.; THUILLEZ, C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 311-320, 2006.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics**: A phylogenetic. Sunderland: Sinauer Associates, 1999.

KIM, J. H. et al. *Aronia melanocarpa* juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 54-64, Nov. 2013.

KINGHORN, A.D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 135-148, Fev. 2001.

KOGA, Y et al. High salt intake enhances blood pressure Increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 31, n. 11, p. 2075-2083, Nov. 2008.

KOPPENOL, W. H. The Haber-Weiss cycle -70 years later. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 229-234, 2001.

KOZLOV, S. et al. Carotid atherosclerosis and endothelial dysfunction in young and middle-aged men with coronary artery disease. **International Journal of Vascular Medicine**, v. 2012, Fev. 2012.

KROL, W. et al. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, v. 1, p. 19-25, Dez. 1996.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia**: bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LATTANZIO, V. et al. Plant phenolics: Secondary metabolites with diverse functions. In: DAA YF F.; LATTANZIO, V. (Org.). **Recent Advances in polyphenol research, volume 1**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1-35.

LEE, Y. J. et al. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. **Cancer Letters**, v. 153, n. 1-2, p. 51-56, Maio 2000.

LI, P. G. et al. Caffeic Acid Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Angiotensin II in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension Research**, v. 4, p. 369-377, Abr. 2005.

LIN, H. H. et al. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v.132, n. 2, p. 880-891, Maio 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: Arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

LOSCALZO, J. Nitric oxide and vascular disease. *New England Journal of Medicine*, v. 333, n. 4, p. 251-253, Jul. 1995.

MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, Maio 2002.

MAFFIA, P. et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 3, p. 353-360, Jun. 2002.

MAGANHA, E. G. et al. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 1-10, Jan. 2010.

MAKHAFOLA, T. J.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 9-13, Mar. 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALHOTRA, S.; PAL SIGH, A. Review of pharmacology of phytochemicals from Indian medicinal plants. **The Internet Journal of Alternative Medicine**, v. 5, n. 1, 2006.

MALLAT, Z. et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 101, n. 8, 841-843, Fev. 2000.

MARCO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARINHO, M.G.V.; SILVA, C.C.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 170-182, 2011.

MAZZUCA, M. Q.; KHALIL, R. A. Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 147-162, Jul. 2012.

MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. P. The pharmacy of the Benedictine monks: The use of medicinal plants in Northeast Brazil during the nineteenth century (1823–1829). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 280-286, Jan. 2012.

MICHALUART, P. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **Cancer Research**, v. 59, n. 10, p. 2347-2352, Maio 1999.

MILLOT, M. et al. Metabolites from the Lichen Ochrolechia parella Growing under Two Different Heliotropic Conditions. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 316-318, Fev. 2007.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, Ago. 2011.

MORIZANE, S. et al. Biphasic time course of the changes in aldosterone biosynthesis under high-salt conditions in dahl salt-sensitive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.32, n. 5, p. 1194-1203, Maio 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dez. 1983.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, p. 17A-21A, Mar. 2010.

NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. **Platelets**, v. 18, n. 3, p. 224-243, Maio 2007.

NATARAJAN, K. et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 17, p. 9090-9095, Ago. 1996.

NDHLALA, A. R. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of African medicinal plants. In: KUETE, V. (Org.). **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry**. London: Elsevier, 2013. p. 621-659.

NDU, O. O. et al. Herb–drug interaction between the extract of *Hibiscus sabdariffa* L. and hydrochlorothiazide in experimental animals. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n.6, p. 640-644, Jun. 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, M. F. et al. Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, p.1-6, 2012.

NGAMJARUS, C.; PATTANITTUM, P.; SOMBOONPORN, C. Roselle for hypertension in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, p. 1-17, Jan. 2010.

OJEDA, D. et al. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ace) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-*o*-sambubiosides from *hibiscus sabdariffa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 7-10, Jan. 2010.

OLIVEIRA, S. G. et al. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 428-437, Mar. 2012.

ORISAKWE, O. E.; HUSAINI, D. C.; AFONNE, O. J. Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 295-298, Mar. 2004.

OZEN, S. et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 27-35, Jan. 2004.

OZYURT, H. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 339, n. 1-2, p. 65-75, Jan. 2004.

PARK, E. H.; KAHNG, J. H. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 22, n. 6, p. 554-558, Dez. 1999.

PERNOW, J.; SHEMYAKIN, A.; BÖHM, F. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus. **Life Sciences**, v. 91, n. 13-14, p. 507-516, Out. 2012.

PIEME, C. A. In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 223-228, Maio 2010.

PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; BOST, G. A. Analyses for Flavonoid Aglycones in Fresh and Preserved *Hibiscus* Flowers. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Org.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 556-563.

QUÍÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, n. 1, p. 125-131, Fev. 2013.

RAHMAN, I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 1, p. S42-S45, 2008.

RAJESWARI, G. et al. *Hibiscus tiliaceus*: A possible immunomodulatory agent. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 7, p. 742-747, Jul. 2013.

RAMIREZ-RODRIGUES, M. M. et al. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. C428-C435, Abr. 2011.

REANMONGKOL, W.; ITHARAT, A. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29, p. 29-38, Mar. 2007.

RENAUD, S.; De LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, Jun. 1992.

RIBEIRO, B. G.; Ribeiro, D. **Suma etnológica brasileira: Etnobiologia**. Petrópolis: Vozes/Finep, 1987.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5-6, p. 410-424, Fev. 2011.

RODRIGUES, G. J et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1-3, p. 251-257, Fev. 2010,

RODRIGUES, S. M. L. et al. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 3, p. 378-385, Mar. 2014.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, Jan. 2011.

ROSA, R. M. et al. Antioxidant and Antimutagenic Properties of *Hibiscus Tiliaceus* L. Methanolic Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 19, p. 7324-7330, Ago. 2006.

ROSSATO, A. E.; CHAVES, T. R. C. **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. In: ROSSATO, A. E. et al. (Org.). **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. Florianópolis: DIOESC, 2012. p. 15-39.

ROSSONI, L. V. et al. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na^+ , K^+ -ATPase in ouabain-induced hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. n. 3, 135, p. 771-781, Fev. 2002.

RYBICKI, E. P. et al. Plant-made therapeutics: An emerging platform in South Africa. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 2, p. 449-459, Mar/Apr. 2012.

SÁ, I. M.; ELISABETSKY, E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: an ethnopharmacological perspective. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 762-768, Ago. 2012.

SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin**: A textbook of pharmacognosy. Stockholm: 5th Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

SANTOS, M. R. A; LIMA, M. R; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244-250, Abr./Jun. 2008.

SANTOS, V. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 68-72, 2011.

SCHACHINGER, V.; BRITTEN, M. B.; ZEIHNER, A. M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. **Circulation**, v. 101, n. 16, p. 1899-1906, Abr. 2000.

SHAHAT, A. A.; MARZOUK, M. S. Tannins and related compounds from medicinal plants of Africa. In: KUETE, V. (Org.). **Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry**. London: Elsevier, 2013. p. 479-555.

SHARMA, R. Polyphenols in Health and Disease: Practice and Mechanisms of Benefits. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Org.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 757-778.

SOUZA, P. et al. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 819-825, Jul. 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

STAMLER, J. S. et al. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. **Circulation**, v. 89, n. 5, p. 2035-2040, Maio 1994.

STEFANELLO, A. G. F.; NOGUEIRA, C. B. C. Direitos Étnicos e Culturais na proteção dos Conhecimentos Tradicionais associados à biodiversidade brasileira. In: FLORES, N. C. S.; POLI, L. M.; ASSAFIM, J. M. L. (Org.). **XXI Congresso Nacional do CONPEDI/UFF**. Florianópolis: FUNJAB, 2012. p. 236-259.

SUSIC, D. et al. Cardiovascular effects of inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system components in hypertensive rats given salt excess. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 4, p. 1177-1181, Abr. 2010.

TIRAPELLI, C. R. et al. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 690-702, Out. 2010.

TOMICH T. P. et al. Agroecology: A review from a global change perspective. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 36, p. 193-222, Nov. 2011.

TOUSOULIS, D.; DAVIES, G.; CRAKE, T. Acetylcholine and Endothelial Function. **Circulation**, v. 98, p.1587-1590, 1998.

TSENG, T. H.; LEE, Y. J. Evaluation of natural and synthetic compounds from East Asiatic folk medicinal plants on the mediation of cancer. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 347-365, Ago. 2006.

TSUMBU, C. N. et al. Antioxidant and antiradical activities of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) leaves and other selected tropical green vegetables investigated on lipoperoxidation and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) activated monocytes. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 818-838, Set. 2011.

TSUMBU, C. N. et al. Polyphenol Content and Modulatory Activities of Some Tropical Dietary Plant Extracts on the Oxidant Activities of Neutrophils and Myeloperoxidase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 628-650, Jan. 2012.

UGAZ, O. I. **Investigación fitoquímica**. 2. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú – Fondo editorial. 1994.

VANHOUTTE, P. M. et al. Modulation of vascular smooth muscle cell contraction by the endothelium. *Annual Review of Physiology*, v. 48, p. 349-80, Mar. 1986.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. New York: Springer, 1996.

WAHABI, H. A. et al. The effectiveness of *Hibiscus sabdariffa* in the treatment of hypertension: a systematic review. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 83-86, Feb. 2010.

WEKSLER, B. B.; MARCUS, A. J.; JAFFE, E. A. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 9, p. 3922-3926, Set. 1977.

WIDLANSKY, M.E et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 7, p. 1149-1160, Out. 2003.

YANG, Y. S. et al. Polyphenols of *Hibiscus sabdariffa* improved diabetic nephropathy via regulating the pathogenic markers and kidney functions of type 2 diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 810-819, Abr. 2013.

YUN, B. S. et al. Two bioactive pentacyclic triterpene esters from the root bark of *Hibiscus syriacus*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 764-766, 1999.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: Univali, 2009.

ZOTA, Ie. G.; MELNIC, E.M.; UNTESCO, M.I. The role of endothelial cell in the immune inflammation initiation during the atherosclerosis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 9, n. 1, p. 224-225, Maio 2008.